PIBB 生物化学与生物物理进展
Progress in Biochemistry and Biophysics
2015, 42(5): 468~475
www.pibb.ac.cn

整合素 α6 在不同转移潜能膀胱癌细胞中的定量差异表达分析 *

陆 微[1)] 杨刚龙[1)] 薛 鹏[2)] 刘昌梅[1)] 关 锋[1)**]

([1)] 江南大学糖化学与生物技术教育部重点实验室，无锡 214122；[2)] 中国科学院生物物理研究所蛋白质组学技术实验室，北京 100101)

摘要 整合素是一类跨膜糖蛋白，能够与细胞外基质结合参与许多生物学过程，尤其是与癌细胞的增殖、迁移等密切相关．目前在研究膀胱癌的发生发展过程中，对整合素的关注较少．本研究利用稳定同位素标记技术(SILAC) 蛋白质定量技术结合质谱分析技术，对 3 株不同转移潜能的膀胱癌细胞株中的蛋白质组差异表达进行研究，并通过蛋白质免疫印迹技术、实时荧光定量 PCR、细胞免疫荧光照相和流式细胞术等多种技术进行验证．同时使用临床组织基因芯片结果对比分析表明，与正常膀胱表皮细胞 HCV29 相比，整合素 α6 在膀胱癌细胞中表达量均有明显的上升，且在非侵染性膀胱癌 KK47 细胞中的表达量最高，侵染性的膀胱癌 YTS1 细胞中表达量次之．这一结果说明整合素 α6 与膀胱癌的发展具有密切关系，并为深入研究整合素 α6 在膀胱癌发生发展中的作用提供了前期基础.

关键词 SILAC，膀胱癌，整合素 α6，蛋白质定量
学科分类号 Q81
DOI: 10.16476/j.pibb.2014.0390

膀胱癌是泌尿系统中最常见的恶性肿瘤之一，根据美国癌症学会的统计信息，膀胱癌的发病率在男性人群常见癌症种类中排名第 4，在女性常见癌症种类中排在第 9 名[1]．2014 年美国新增膀胱癌发病病例约为 74 690 例，占所有新增癌症病例的 4.5%；2014 年预估的死亡病例为 15 580 例，占所有因癌症而死亡病例的 2.7%．2012 年中国肿瘤登记地区膀胱癌的发病率为 6.61/10 万，列恶性肿瘤发病率的第 9 位．膀胱癌可发生于任何年龄，甚至于儿童．其发病率随年龄增长而增加，高发年龄为 50～70 岁．男性膀胱癌发病率为女性的 3～4 倍[2]．目前临床使用的膀胱癌诊断标志物为组织多肽抗原 (tissue polypeptide antigen，TPA) 和癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen，CEA)等，而这两种肿瘤标志物的特异性差，在多种癌症发生时都会升高．如 TPA 在肝癌、胃癌、肺癌、大肠癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫颈癌以及膀胱癌中都会升高[3]．为了能够在膀胱癌发展早期就能够及时确诊病情，应该建立更多的早期肿瘤标志物检测方法.

整合素是一类跨膜糖蛋白，它们能够与胞外基质相结合，从而调节细胞与基质、细胞与细胞黏附[4]．整合素也是一种由 18 种 α 亚基和 8 种 β 亚基构成的异质二聚体蛋白，总共形成 24 种不同的异质二聚体整合素蛋白[5]．研究表明，整合素通过与胞外基质的结合参与许多生物过程，从而调节细胞的迁移、侵染[6]．另外，整合素在肿瘤不同发展阶段中的表达也受到不同程度的调节，使其成为癌症诊断和治疗的潜在目标[5]．其中，整合素 α6 由基因 *ITGA6* 编码，含有 1 130 个氨基酸．整合素 α6 能够与 β1 或者 β4 结合形成 α6β1 或者 α6β4 二聚体，并能够与细胞外基质(extracellular matrix，ECM)层黏连蛋白(laminin，LN)结合[7-8]．整合素与 ECM 的结合会触发细胞内相关的信号通路，从而影响细胞内的生物学过程，也包括癌症的发展过

* 国家自然科学基金青年科学基金(81402115)，江苏省自然科学基金(BK20140172)和中国科学院仪器设备功能开发技术创新项目(yg2010001)资助项目.
** 通讯联系人.
Tel: 0510-85918126, E-mail: fengguan@jiangnan.edu.cn
收稿日期：2015-03-24，接受日期：2015-04-14

程[9]．研究发现，整合素 α6 在膀胱癌发展不同阶段的表达存在差异：在膀胱癌发展的初级阶段，整合素 α6 在基底细胞中大量表达，在具有侵染性质的膀胱癌细胞中整合素 α6 的表达具有较大的可变性[10].

利用质谱对蛋白质做相对定量研究的方法包括两种策略．一种是基于凝胶为分离手段来进行质谱定量，如双向电泳(two-dimensional electrophoresis，2-DE)或者以此为基础发展双向差异凝胶电泳(two dimension difference gel electrophoresis，2D-DIGE)；另外一种基于高效液相色谱为分离手段的质谱定量，这其中又包括非同位素标记法和同位素标记法[11-12]．目前，蛋白质质谱定量中使用比较广泛的是同位素标记方法，包括体外标记法和体内标记法[12]．细胞培养条件下稳定同位素标记技术(stable isotope labeling with amino acids in cell culture，SILAC)是体内标记方法之一，该方法培养细胞时向培养基中加入稳定同位素标记的必需氨基酸，新合成蛋白质中的氨基酸被相应同位素标记氨基酸代替，然后将来自经不同同位素标记的蛋白质样本等量混合后进行质谱鉴定，比较不同细胞样本中的蛋白质表达差异[13-14]．相比于传统方法及其他定量方法，SILAC 技术具有以下优势：a．可信度高，减少了由于样品制备操作带来的误差；b．高通量，能够同时比较多种细胞样本；c．灵敏度更高，重复率较高，鉴定到的差异表达蛋白更多；d．体内标记，更接近于细胞原始生长状态[15].

人膀胱正常上皮细胞 HCV29、人膀胱非肌层浸润性膀胱癌细胞 KK47 和人膀胱浸润性癌细胞 YTS1 是常用于膀胱癌研究的三株典型细胞株．Hakomori 等[16-17]分析了这 3 株细胞株内糖鞘脂的表达，发现 HCV29 表达高水平的神经节苷脂 GM2，几乎不表达 GM3；KK47 表达高水平的 GM3，无 GM2 的表达；而 YTS1 只表达低水平的 GM2，无 GM3 的表达．Satoh 等[18]将 KK47 和 YTS1 培养在铺有层黏连蛋白 5(LN-5)的平板上时，YTS1 表现出更强的迁移和侵袭能力．王华等[19]利用这 3 株细胞株研究双突变溶瘤腺病毒联合吉西他滨治疗裸鼠原位膀胱癌的效果．丁明霞等[20]利用 HCV29 细胞株研究单抗 KMP1 对 EJ 细胞生物学功能的影响．本研究将以这三个细胞株为研究模型，利用 SILAC 技术定量分析整合素 α6 的表达变化，以期为进一步研究整合素 α6 的生物学功能及作用机理提供前期工作基础.

1　材料与方法

1.1　细胞培养

HCV29、KK47 和 YTS1 细胞为美国华盛顿大学 Sen-itiroh Hakomori 教授馈赠，细胞均培养在含有 10% 胎牛血清(Gibco BRL，USA)和 1%双抗(Gibco BRL)的 RPMI-1640(Gibco BRL)完全培养基中，培养条件为：37℃，CO_2 浓度 5%.

蛋白质定量中所用的 3 株细胞株 HCV29、KK47 和 YTS1 分别在含有轻标(K0R0)；中标(K4R6) 和重标 (K8R10) 的 RPMI-1640 (Thermo Scientific，USA)培养基中培养，培养基另外还含有 10% Dialyzed-FBS (Thermo Scientific)、1% 双抗(Gibco BRL)以及 200 mg/L 脯氨酸(Thermo Scientific)[21]．培养 5 代后分别进行质谱分析，确保细胞内的赖氨酸和精氨酸达到 95%的替代率.

1.2　细胞划痕实验

将适量的 3 株细胞分别接入 6 孔板中，在完全培养基中培养过夜．吸去培养基，分别用加样器枪头在每个孔中划线，用 1×PBS 冲洗 3 次，加入不含血清的培养基，分别在培养 0、12、24 和 36 h 时进行拍照.

1.3　蛋白质提取

当细胞密度达到 90%时提取细胞全蛋白：经 1×PBS 多次冲洗后的细胞加入适量含 1% PMSF 和 0.1% 抑肽酶的组织蛋白抽提试剂(Thermo Scientific)；冰上孵育 30 min 后，4℃ 14 000 *g* 离心 15 min；取上清，同时使用 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒(Beyotime biotechnology，China)测定蛋白质浓度，–80℃保存备用.

1.4　蛋白质定量技术

将来自 3 株细胞的全蛋白 1∶1∶1 等量混合，然后使用滤膜辅助样品处理(filter-aided sample preparation，FASP)方法[22]酶解蛋白样品．将适量混合蛋白样品加入 10 ku 滤膜离心管(Merck Millipore，USA)14 000 *g* 离心 15 min；随后加入 300 μl 的 8 mol/L 尿素溶液吹打数次后 14 000 *g* 离心 15 min；再加入 150 μl 10 mmol/L 二硫苏糖醇(dithiothreitol，DTT)溶液混匀，56℃静置 45 min，14 000 *g* 离心 10 min；加入 150 μl 20 mmol/L 碘乙酰胺(iodoacetamide，IAA)溶液混匀，避光静置 30 min, 14 000 *g* 离心 10 min；加入 200 μl 40 mmol/L 碳酸氢铵溶液，14 000 *g* 离心 10 min，重复 3 次；最后加入适量的胰蛋白酶(Promega，USA)溶液置

于37℃反应12 h后14 000 *g*离心10 min，收集流出液．多肽混合液使用C18柱(Merck Millipore)除盐处理后送至超高分辨率液相串联质谱LTQ-Orbitrap分离鉴定．

1.5　数据分析

质谱得到的数据使用软件MaxQuant (V. 1.2.2.5)[23]进行分析．设置参数如下：蛋白质以及多肽的假阳性率小于0.01，肽段氨基酸数量大于6，Andromeda[24]对照IPI人源数据库(3.85)搜索数据，酶为胰蛋白酶，固定修饰为酰胺甲基化，可变修饰为N端甲基化和甲硫氨酸氧化，SILAC多肽对设置为Arg6和Lys4或者Arg10和Lys8，最大允许2个错切，母离子质量偏差小于7，二级碎片离子偏差小于0.5个单位．

1.6　蛋白质免疫印迹

将等量蛋白质样品上样至10% SDS-PAGE (Bio-Rad，USA)，电泳结束后将蛋白转膜至0.45 μm PVDF膜上．室温下5%脱脂奶粉封闭2 h；TBST清洗膜3遍，将抗整合素α6抗体(Abgent，China)按照1∶1 000的比例孵育，置于4℃摇床震荡过夜；再加入1∶5 000稀释的带有HRP标记的二抗(Beyotime biotechnology，China)溶液室温孵育3 h；使用Pro-Light HRP化学发光检测试剂(Tiangen bioteh，China)在Bio-Rad ChemiDoc™ XRS+(Bio-Rad)成像系统显色，拍照．

1.7　实时荧光定量PCR

RNA提取参照RNA提取试剂盒(Cwbiotech，China)说明书进行．提取的RNA在逆转录酶的作用下合成cDNA后-80℃保存备用．实时荧光定量PCR反应使用UltraSYBR Mixture试剂盒(CWbiotech)完成．引物由上海英潍捷基贸易有限公司合成，上游引物序列：5′ ATCCGGAAATA-TGGAGACCC 3′，下游引物序列：5′ CGTTCT-GTTGGCTCTCTGC 3′．cDNA和引物分别稀释5倍和2倍后加入反应体系，然后使用qPCR仪(Bio-Rad)检测荧光信号值的变化并导出数据．实验3次平行，3次重复后做最后的数据统计，并使用Prism软件作图．

1.8　细胞免疫荧光组化

将灭菌圆形盖玻片置于24孔细胞培养板中，加入RPMI-1640培养基，接种适量细胞．PBS冲洗3次，加入固定液4%多聚甲醛置于室温固定15 min；吸去固定液，PBS冲洗3次，加入通透液2%曲拉通室温放置10 min；弃通透液，PBS冲洗3次，加入5%脱脂奶粉4℃封闭10 h．吸去废液，PBS冲洗3次，加入1∶100稀释的抗整合素α6抗体(Abgent)溶液，4℃孵育10 h，吸去废液，PBS冲洗3次，加入1∶1 000稀释的带Cy3的二抗溶液，室温孵育3 h；加入4 mg/L DAPI溶液室温震荡孵育10 min，封片后使用尼康C2Si激光共聚焦系统(Nikon，Japan)拍照成像．

1.9　流式细胞术

在12孔板中加入适量细胞，培养12 h．随后使用胰酶消化细胞，并将细胞转移至离心管中，用预冷的PBS冲洗3次．随后用1 ml PBS重悬细胞，按1∶50比例加入抗整合素α6抗体，冰浴2 h．离心，PBS冲洗2次，1 ml PBS重悬细胞，1∶500加入二抗，冰浴1 h．用PBS冲洗2遍，1 ml PBS重悬细胞，转移至流式细胞管中．使用流式细胞仪(Calibur，BD，USA)检测荧光强度．

2　结果与分析

2.1　3株细胞的形态差异和生存习性的异同

HCV29是一株人膀胱正常上皮细胞株，细胞形态为梭状，培养一定时间后细胞排列整齐，间隙均匀．KK47是人膀胱非肌层浸润性膀胱癌细胞株，细胞形态呈不规则椭球状，细胞大小较HCV29细胞小，培养一段时间后细胞间隙很小．YTS1是人膀胱浸润性癌细胞株，呈长梭状，也能够分裂至较高密度(图1a)．从划痕实验(图1b)可以看到，YTS1细胞的迁移能力最强，24 h后细胞基本占满划痕区，36 h后划痕区域消失．KK47和HCV29细胞的迁移能力相当，36 h后划痕区域内均只有少量细胞．

2.2　定量蛋白质组研究表明整合素α6在KK47细胞株的中表达量最高

分别使用含有同位素轻标氨基酸(K0R0)、中标氨基酸(K4R6)和重标氨基酸(K8R10)的培养基培养细胞HCV29，KK47和YTS1，随后用超高分辨率液相串联质谱LTQ-Orbitrap分析鉴定三株细胞蛋白质组定量数据．在蛋白质组定量数据中共发现3个整合素α6的肽段(图2a)．其中肽段TAHIDVHFLK为整合素α6的一个特征肽段，它的理论分子质量在HCV29细胞株中为1179.64，在KK47细胞中为1183.64，在YTS1细胞中为1187.64(图2b)．根据肽段质谱信号数据可以得到整合素α6在HCV29、KK47、YTS1这3株细胞中表达的比例约为：1∶18∶14．

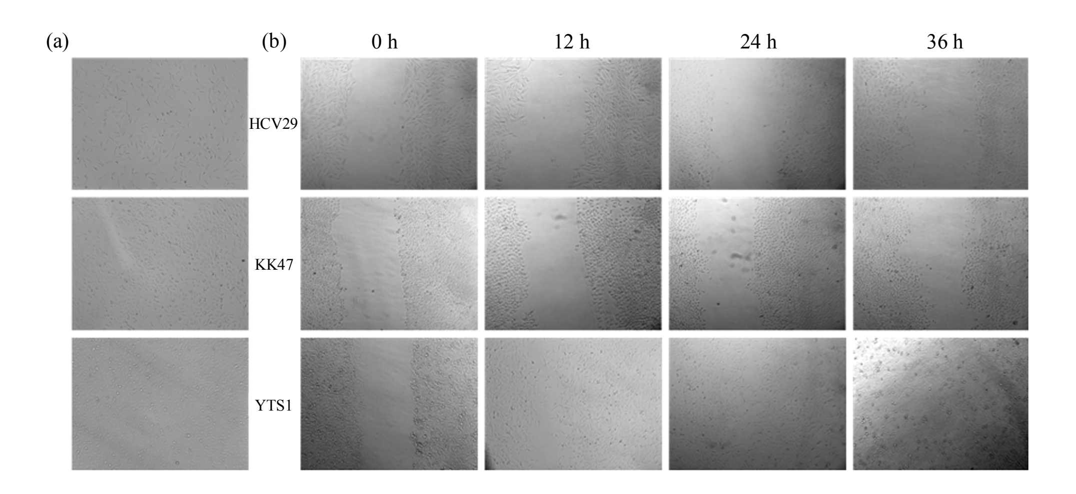


Fig. 1　Morphology and motility of HCV29, KK47 and YTS1 cells

(a) Cell morphology of HCV29, KK47 and YTS1 cells (×100). (b) Wound scratch assay of 3 cells (×100). The wound scratch area was pictured at 0 h, 12 h, 24 h and 36 h.

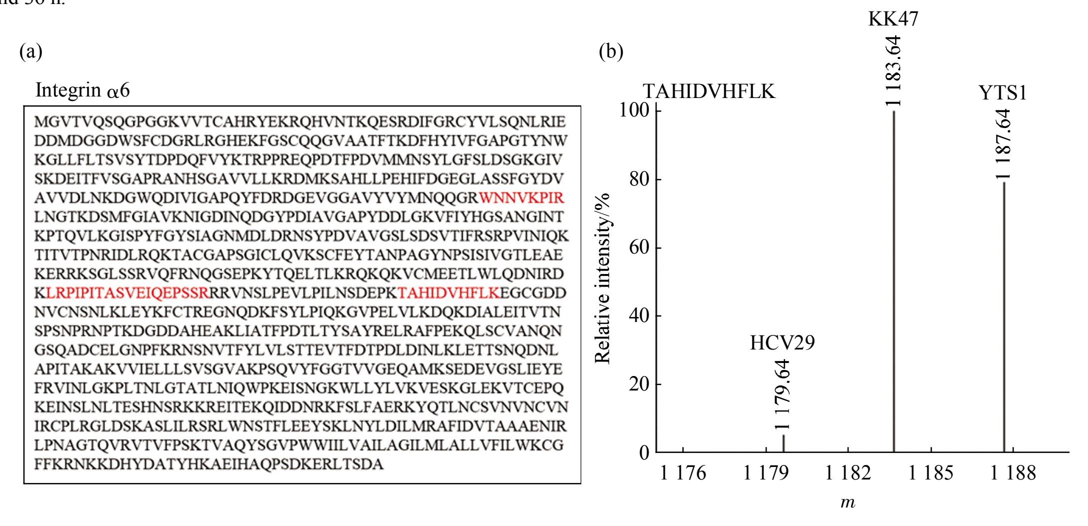


Fig. 2　The unique peptide of integrin α6 detected by LC-MS

(a) The full sequence of integrin α6 is shown and the peptides detected in LC-MS are shown in red. (b) The peptides TAHIDVHFLK at mass 1179.64, 1183.64 and 1187.64 are from HCV29, KK47 and YTS1.

2.3　蛋白质定量数据的验证

为了验证质谱鉴定结果，本研究通过 Western blotting 和 qPCR 的方法对整合素 α6 在 3 株细胞株中的表达做了验证．整合素 α6 蛋白存在相差 18 个氨基酸的 A、B 两种亚型，这两种亚型是由于 mRNA 的不同拼接而产生的[25]，因此在 Western blotting 的结果中出现两条目的条带．Western blotting 结果表明整合素 α6 在 KK47 细胞株中的表达量最高(图 3a)．利用 qPCR 技术对 3 株细胞内基因 ITGA6 在转录水平上的表达进行验证分析，结果显示 ITGA6 在 KK47 细胞中表达最高，在 YTS1 细胞中的表达也远高于在 HCV29 细胞中的表达(图 3b)，基因 ITGA6 的表达趋势与蛋白质定量实验数据完全一致．Western blotting 结果中 YTS1 细胞与 HCV29 细胞之间的区别不明显，这有可能是由于抗体特异性不强所致．

依据公开数据库中 Modlich 等[26]提供的基因芯片数据，该数据包括了 4 例正常膀胱组织样本，28 例具有侵染性质膀胱癌组织样本和 22 例原位癌组织样本中基因 ITGA6 的表达数据．分析发现，膀胱癌症组织中整合素 α6 的表达量高于正常膀胱组织，且在癌症早期组织中整合素 α6 的表达量最高(图 3c)，该临床研究数据与本研究中细胞模型中整合素 α6 的表达情况一致．

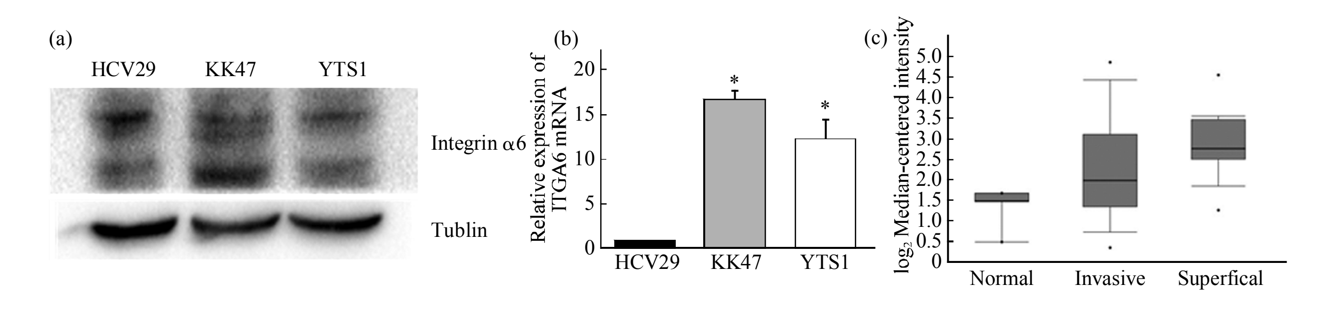


Fig. 3 Validation of SILAC data

(a) Expression of integrin α6 determined by Western blotting. (b) The expression of ITGA6 mRNA examined by qPCR (*P < 0.05). (c) The expression of ITGA6 mRNA by gene microarray in open-access database (www.oncomine.org).

2.4 细胞免疫组化实验验证整合素 α6 在活细胞中的表达情况

本研究进一步通过细胞免疫组化实验和流式细胞术确认整合素 α6 在活细胞中的表达和定位．使用特异性识别整合素 α6 的抗体以及带有荧光基团 Cy3 的二抗对细胞进行染色及拍照，并通过软件 ImageJ 提取图片中每个细胞的平均荧光强度并转换成数值制成图表来直观表示整合素 α6 在 3 株细胞株中的表达情况．如图 4a 所示，其中蓝色荧光 DAPI 显示细胞核位置，红色荧光 Cy3 显示整合素 α6 位置．从单位细胞质面积来看 KK47 细胞的亮度最强，YTS1 细胞其次(图 4b)．通过流式细胞术检测活细胞中整合素 α6 的表达(图 4c)，实验结果进一步表明，整合素 α6 在 KK47 细胞表面的表达最强．

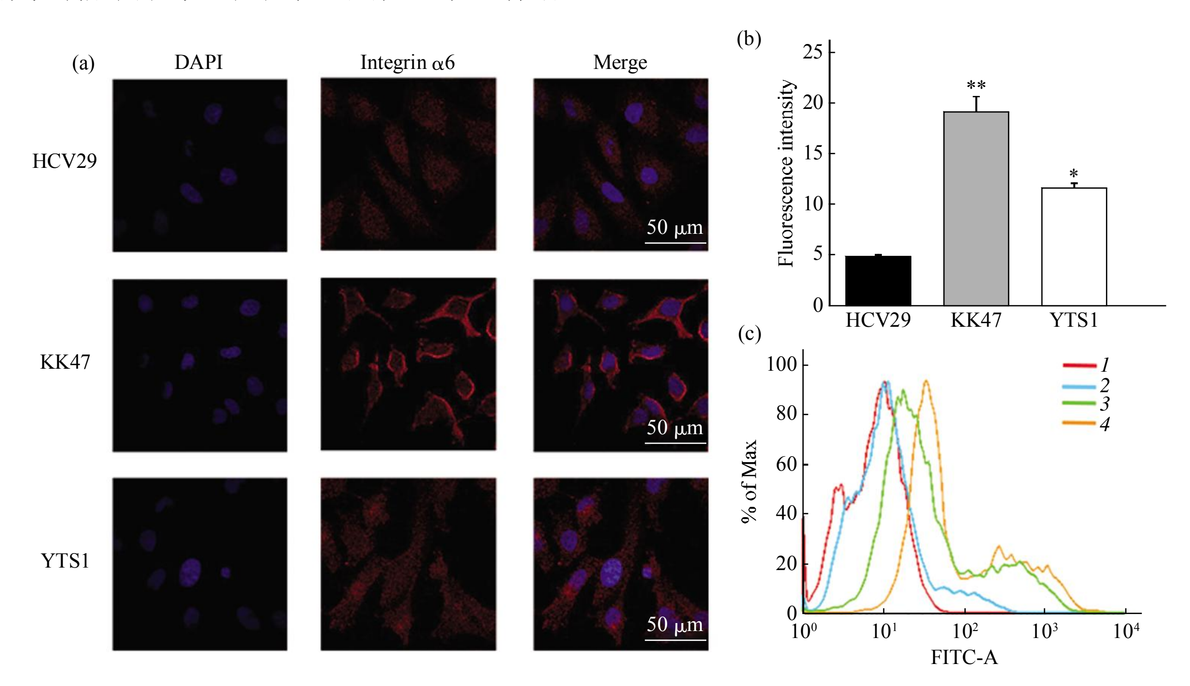


Fig. 4 Expression of integrin α6 observed by immunofluorescence staining and flow cytometry

(a) Direct reflection of the expression of integrin α6 by immunofluorescence staining. Cell nuclei were stained with DAPI, and integrin α6 was stained with Cy3. KK47 showed the highest expression than other cells. (b) The average fluorescence intensity of every cell was statistic analyzed by ImageJ (*P < 0.05; **P < 0.01). (c) The expression pattern of integrin α6 in 3 cell lines was confirmed using flow cytometry. Cells were stained with anti-integrin α6 antibody and FITC conjugated secondary antibody (*1*: Isotype control; *2*: HCV29 cells; *3*: YTS1 cells; *4*: KK47 cells.)

3 讨 论

整合素是一类存在于细胞膜上的二聚体蛋白，它们均由一个 α 亚基和一个 β 亚基构成．研究表明，整合素通过与胞外基质的结合参与许多生物过程，从而调节细胞的迁移、侵染[6]．整合素 α6 亚

基能够与 β1 或 β4 相结合形成完整的 α6β1 或 α6β4 整合素蛋白行使功能，这两种整合素均能够与 LN 相结合[7-8]．在经过表皮细胞生长因子(epidermal growth factor，EGF)处理过后的角质细胞中，整合素 α6 和 β4 的耦合能够促进细胞分裂 G1 期到 S 期的过程[27]．另外，整合素 α6β4 与 LN 的结合能够促进 RAS 介导的角质细胞的转化过程[28]．这些都说明整合素 α6 在细胞增殖过程中有着重要作用．将整合素 β4 导入到不表达整合素 β4 的乳腺癌细胞中后，细胞内从磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase，PI3K)到 Rac 的信号通路随即被激活，同时细胞的迁移能力也得到了增强[29]．这些研究不论是从整合素 α6 的表达情况方面还是其在细胞内参与的信号通路方面都展示了整合素 α6 对细胞迁移过程的影响．

研究表明，在许多肿瘤组织中整合素 α6 的表达量会异常增加[30]．在肝癌的研究中也有研究报道肝癌和整合素 α6 有着密切联系，随着肝癌的发展，大多数组织能够检测到整合素 α6，并且表达水平和患者的预后呈负相关[31]．另外，也有研究人员在对乳腺癌细胞系的研究中发现整合素 α6 的高表达和肿瘤的发生、迁移潜能有关[32]．

细胞需要通过分布在细胞膜上的多种蛋白与外界环境进行信息交流或者指导迁移运动，细胞膜上特定蛋白的变化必然会导致细胞生理性质的改变．在肝癌细胞中整合素 α6 与 LN 的结合通过 PI3K/AKT 和 MAPK/ERK 信号通路影响细胞的转移．如果下调整合素 α6 的表达，肝癌细胞的迁移能力也随之降低，所以肝癌细胞内整合素 α6 的高表达预示着其具有较强的迁移能力[33]．膀胱癌细胞株 KK47、YTS1 相对于正常膀胱上皮细胞株 HCV29 有明显的整合素 α6 的高表达，同时它们相对于 HCV29 也具有较强的迁移能力．整合素 α6 是否和细胞迁移能力有直接的关系？整合素 α6 异常表达涉及的细胞信号通路是什么？在后续研究中，我们将通过降低 KK47、YTS1 细胞内整合素 α6 的表达或者在 HCV29 细胞中高表达整合素 α6，以观察对细胞迁移的影响，并探究与之相关的信号通路．另外，将通过使用免疫共沉淀技术确定与整合素 α6 相互作用的整合素亚单位如 β4 等，以及二者相互作用的机制及下游信号通路，以期阐明整合素相关蛋白在膀胱癌中的作用．

本研究首次通过 SILAC 蛋白质相对定量技术对整合素 α6 在膀胱癌发展模型细胞系(HCV29、KK47、YTS1)中的表达做了定量比较研究分析，并且通过蛋白质免疫印迹、荧光定量 PCR 技术、细胞组化染色技术和流式细胞术对定量数据进行验证，同时也与临床数据进行对比．多重数据比对结果显示，整合素 α6 在非侵染膀胱癌细胞株 KK47 中的表达量最高，在恶性膀胱癌细胞株 YTS1 中的表达量其次，并且均远高于正常膀胱上皮细胞系 HCV29 中的表达量．综上所述，本研究确定了整合素 α6 在膀胱癌细胞系中的差异表达情况，并为进一步深入研究其分子功能提供了前期基础．

参 考 文 献

[1] Siegel R, Ma J, Zou Z, *et al*. Cancer statistics, 2014. CA: a cancer Journal for Clinicians, 2014, **64**(1): 9-29

[2] 韩苏军, 张思维, 陈万青, 等.中国膀胱癌死亡现状及流行趋势分析. 现代泌尿外科杂志, 2013, **18**(3): 228-232
Han S J, Zhang S W, Chen W Q, *et al*. Journal of Modern Urology, 2013, **18**(3): 228-232

[3] Shah J B, Mckiernan J M. Novel therapeutics in the treatment of bladder cancer. Current Opinion in Urology, 2004, **14**(5): 287-293

[4] Hynes R O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. Cell, 1992, **69**(1): 11-25

[5] Hynes R O. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. Cell, 2002, **110**(16): 673-687

[6] Mizejewski G J. Role of integrins in cancer: survey of expression patterns. Experimental Biology and Medicine, 1999, **222**(2): 124-138

[7] Hemler M E, Crouse C, Sonnenberg A. Association of the VLA alpha 6 subunit with a novel protein. A possible alternative to the common VLA beta 1 subunit on certain cell lines. The Journal of Biological Chemistry, 1989, **264**(11): 6529-6535

[8] Lee E C, Lotz M M, Steele G D, Jr., *et al*. The integrin alpha 6 beta 4 is a laminin receptor. J Cell Biol, 1992, **117**(3): 671-678

[9] Guo W, Giancotti F G. Integrin signalling during tumour progression. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004, **5**(10): 816-826

[10] Liebert M, Wedemeyer G, Stein J A, *et al*. The monoclonal antibody BQ16 identifies the alpha 6 beta 4 integrin on bladder cancer. Hybridoma, 1993, **12**(1): 67-80

[11] Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. Nature, 2003, **422**(6928): 198-207

[12] Sechi S, Oda Y. Quantitative proteomics using mass spectrometry. Curr Opin Chem Biol, 2003, **7**(1): 70-77

[13] Ong S E, Blagoev B, Kratchmarova I, *et al*. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. Molecular & Cellular Proteomics, 2002, **1**(5): 376-386

[14] Ong S E, Kratchmarova I, Mann M. Properties of 13C-substituted arginine in stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). Journal of Proteome Research, 2003, **2**(2): 173-181

[15] Craft G E, Chen A, Nairn A C. Recent advances in quantitative

neuroproteomics. Methods, 2013, **61**(3): 186-218

[16] Hakomori S I. Glycosynaptic microdomains controlling tumor cell phenotype through alteration of cell growth, adhesion, and motility. FEBS Letters, 2010, **584**(9): 1901-1906

[17] Guan F, Handa K, Hakomori S I. Specific glycosphingolipids mediate epithelial-to-mesenchymal transition of human and mouse epithelial cell lines. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, **106** (18): 7461-7466

[18] Satoh M, Ito A, Nojiri H, *et al*. Enhanced GM3 expression, associated with decreased invasiveness, is induced by brefeldin A in bladder cancer cells. International Journal of Oncology, 2001, **19**(4): 723-731

[19] 王 华, 刘 卓, 王宗平, 等. 双突变溶瘤腺病毒联合吉西他滨治疗裸鼠原位膀胱癌的效果.中华肿瘤杂志, 2013, **35**(6): 412-417
Wang H, Liu Z, Wang Z P, *et al*. Chin J Oncology, 2013, **35**(6): 412-417

[20] 丁明霞, 李 翀, 左毅刚, 等. 膀胱癌 EJ 细胞的 CD44 异常糖基化及其单抗 KMP1 的生物学功能研究. 中国肿瘤临床, 2011, **38**(13): 759-762
Ding M X, Li C, Zuo Y G, *et al*. Chin J Clin Oncology, 2011, **38**(13): 759-762

[21] Bendall S C, Hughes C, Stewart M H, *et al*. Prevention of amino acid conversion in SILAC experiments with embryonic stem cells. Molecular & Cellular Proteomics, 2008, **7**(9): 1587-1597

[22] Wisniewski J R, Zougman A, Nagaraj N, *et al*. Universal sample preparation method for proteome analysis. Nature Methods, 2009, **6**(5): 359-362

[23] Cox J, Matic I, Hilger M, *et al*. A practical guide to the MaxQuant computational platform for SILAC-based quantitative proteomics. Nature Protocols, 2009, **4**(5): 698-705

[24] Cox J, Neuhauser N, Michalski A, *et al*. Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. Journal of Proteome Research, 2011, **10**(4): 1794-1805

[25] Hogervorst F, Kuikman I, Van Kessel A G, *et al*. Molecular cloning of the human alpha 6 integrin subunit. Alternative splicing of alpha 6 mRNA and chromosomal localization of the alpha 6 and beta 4 genes. European Journal of Biochemistry/FEBS, 1991, **199** (2): 425-433

[26] Modlich O, Prisack H-B, Pitschke G, *et al*. Identifying superficial, muscle-invasive, and metastasizing transitional cell carcinoma of the bladder: use of cDNA array analysis of gene expression profiles. Clinical Cancer Research, 2004, **10**(10): 3410-3421

[27] Mainiero F, Murgia C, Wary K K, *et al*. The coupling of alpha6beta4 integrin to Ras-MAP kinase pathways mediated by Shc controls keratinocyte proliferation. The EMBO Journal, 1997, **16**(9): 2365-2375

[28] Dajee M, Lazarov M, Zhang J Y, *et al*. NF-kappaB blockade and oncogenic Ras trigger invasive human epidermal neoplasia. Nature, 2003, **421**(6923): 639-643

[29] Shaw L M, Rabinovitz I, Wang H H, *et al*. Activation of phosphoinositide 3-OH kinase by the alpha6beta4 integrin promotes carcinoma invasion. Cell, 1997, **91**(7): 949-960

[30] Mercurio A M, Rabinovitz I. Towards a mechanistic understanding of tumor invasion——lessons from the alpha6beta 4 integrin. Seminars in Cancer Biology, 2001, **11**(2): 129-141

[31] Torimura T, Ueno T, Kin M, *et al*. Coordinated expression of integrin alpha6beta1 and laminin in hepatocellular carcinoma. Human Pathology, 1997, **28**(10): 1131-1138

[32] Mukhopadhyay R, Theriault R L, Price J E. Increased levels of alpha6 integrins are associated with the metastatic phenotype of human breast cancer cells. Clinical & Experimental Metastasis, 1999, **17**(4): 325-332

[33] Lv G, Lv T, Qiao S, *et al*. RNA interference targeting human integrin alpha6 suppresses the metastasis potential of hepatocellular carcinoma cells. European Journal of Medical Research, 2013, **18**(1): 52-59

Quantitative Analysis of Integrin α6 in Bladder Cancer Cell Lines*

LU Wei[1)], YANG Gang-Long[1)], XUE Peng[2)], LIU Chang-Mei[1)], GUAN Feng[1)*]

([1)] *Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry & Biotechnology Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi* 214122, China;
[2)] *Laboratory of Proteomics, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100101, China)

Abstract The integrins, a family of transmembrane proteins, function in cell-to-cell and cell-to-extracellular matrix (ECM) adhesive interactions, and influence cell signaling of cell growth and differentiation. Expression of integrin α6 in three bladder cancer cell lines, HCV29, KK47 and YST1 were quantitatively analyzed by LC-MS using stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC), a simple and powerful proteomic strategy. The results showed that the non-invasive bladder cancer cell line KK47 expressed the highest level of integrin α6. The expression of integrin α6 in invasive bladder cancer cell line YTS1 was also higher than in normal bladder epithelial cell line HCV29. Furthermore, these results were confirmed by Western blotting, qPCR, immunohistochemistry and flow cytometry. Clinical data of mRNA ITGA6 expression pattern from open-access database (www.oncomine.org) showed the same result during bladder cancer progression. All these indicated that integrin α6 is associated with the invasion progress of the bladder cancer. The preliminary data in this study may sparkle the fundamental role of integrin α6 in the research of bladder cancer.

Key words SILAC, bladder cancer, integrin α6, protein quantification
DOI: 10.16476/j.pibb.2014.0390

---

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation for Young Scientists of China (81402115), The Natural Science Foundation of Jiangsu Province, China (BK20140172), The Scientific Instruments Development and Technical Innovation Program of Chinese Academy of Sciences (yg2010001)

**Corresponding author.
Tel: 86-510-85918126, E-mail: fengguan@jiangnan.edu.cn

Received: March 24, 2015 Accepted: April 14, 2015